



**Universidade Federal de Santa Catarina**  
**Centro de Ciências Físicas e Matemáticas**  
**Departamento de Química**  
**Curso de Graduação em Química Bacharelado**

# **ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HIDRÓXI-NAFTÓICOS**

**JANIO VENTURINI JUNIOR**

**FLORIANÓPOLIS/SC**  
**NOVEMBRO – 2008**

**JANIO VENTURINI JUNIOR**

# **ESTUDO DA FLUORESCÊNCIA DE ÁCIDOS HIDRÓXI-NAFTÓICOS**

Monografia apresentada ao curso de Graduação em  
Química, da Universidade Federal de Santa Catarina –  
UFSC, como requisito parcial para obtenção do grau de  
Bacharel em Química

**Coordenadora de Estágio: Profa. Dra. Inês Maria Costa Brighente**

**Orientadores: Profa. Dra. Haidi Dálida Lentz Fiedler  
Prof. Dr. Faruk José Nome Aguilera**

**FLORIANÓPOLIS / SC**

**NOVEMBRO – 2008**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por pensarem feliz e erroneamente que eu tenho cabeça o suficiente para fazer as coisas do jeito certo.

Aos meus dois irmãos, que me orgulham constantemente. Ao Lucas, por ser parceiro demais, pra qualquer coisa mesmo. Ao Vitor, além de ser o irmão que eu estou estragando, por ter contribuído no trabalho.

Ao Professor Faruk, por ter sido meu modelo durante os anos do curso e pela capacidade absurda de compreensão, tendo sido mais que um orientador.

À Professora Haidi, pela confiança em mim depositada e por me ensinar a não abaixar a cabeça quando estiver certo, sendo também mais que uma orientadora.

À Tia Nete, que era minha mãe aqui em Floripa.

À Duda e à Cláudia, as irmãs que eu adotei.

Aos amigos de Floripa, principalmente ao Renato, pela marinheiragem, à Sara, pela comida, à Carol, pelo sufocamento, à Bia, pelas músicas colonas e ao Alan, por saber trocar pneus.

Aos amigos de Sidera: o Carlinhos, o Poka, o Tiago, o Graxa, o Duan, o Bruno, o Evandro, o Coyote e o Jediel, dentre outros, que constantemente tentavam me impedir de concluir este trabalho.

Aos amigos do Laboratório, por fazerem deste um bom lugar para se trabalhar; e principalmente ao Bruno, ao Marcelo e ao Jorge, que contribuíram para o trabalho.

Aos Professores Frank H. Quina, Miguel G. Neumann e António Maçanita, por contribuírem com seu tempo e seu intelecto e por permitirem que utilizássemos seus equipamentos para desenvolver o presente trabalho.

À UFSC, ao CNPq e à CAPES.

*“Fiat lux et facta est lux.”*

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	iv
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 LEIS DA FOTOQUÍMICA .....	1
1.2 EMISSÃO OU DISSIPAÇÃO DE ENERGIA POR MOLÉCULAS EXCITADAS .....	3
1.2.1 Processos não-radiantes de perda de energia no estado líquido .....	3
1.2.2 Emissão radiante por fluorescência .....	5
1.2.3 Espectro Fluorescente .....	7
1.3 CARACTERÍSTICAS DOS FLUORÓFOROS .....	9
1.3.1 Estrutura das sondas fluorescentes .....	9
1.3.2 Tempos de vida e Rendimento quântico .....	10
1.4 REATIVIDADE NO ESTADO EXCITADO .....	12
2. JUSTIFICATIVA .....	14
3. OBJETIVOS .....	15
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	16
4.1 REAGENTES.....	16
4.2 ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA .....	16
4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE VIDA.....	17
4.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	17
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
5.1 SEÇÃO EMPÍRICA.....	18
5.1.1 Espectros de emissão .....	18
5.1.2 Determinação dos rendimentos quânticos .....	18
5.1.3 Previsão dos $pK_a$ s do estado singlete excitado.....	21
5.1.4 Tempos de vida do estado $S_1$ .....	22
5.1.5 Tempos de vida com IRF de picossegundos .....	24
5.1.6 Equilíbrios no estado excitado .....	25
5.2 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS .....	27
5.2.1 Cálculo da energia das estruturas no estado fundamental .....	27
5.2.2 Estiramento da ligação O–H fenólica .....	32

6. CONCLUSÕES .....	33
---------------------	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Cruzamento de curvas potenciais (Cowan <i>et al.</i> , 1978).....	4
<b>Figura 2</b> – Diagrama de Jabłoński simplificado.....	5
<b>Figura 3</b> – Diagrama de Jabłoński completo.....	7
<b>Figura 4</b> – Absorção e fluorescência do antraceno.....	8
<b>Figura 5</b> – Excitação do fluoróforo em diferentes comprimentos de onda.....	9
<b>Figura 6</b> – Exemplos de tensão na estrutura dos fluoróforos.....	10
<b>Figura 7</b> – Diagrama de Jabłoński para meios radiantes e não radiantes.....	11
<b>Figura 8</b> – Ácidos utilizados no trabalho.....	16
<b>Figura 9</b> – Espectros de emissão de fluorescência das sondas (a) $\alpha$ -HNA, (b) $\beta$ -HNA, (c) $\gamma$ -HNA e (d) $\delta$ -HNA utilizados no cálculo do rendimento quântico....	20
<b>Figura 10</b> – Espectros de tempo de vida de fluorescência para as sondas em diferentes pHs.....	22
<b>Figura 11</b> – Espectro resolvido no tempo de emissão da sonda $\alpha$ em HClO <sub>4</sub> 6M.....	24
<b>Figura 12</b> – Rota de desprotonação dos ácidos no estado fundamental (acima) e uma possibilidade no estado excitado (abaixo).....	25
<b>Figura 13</b> – Desprotonação por mecanismo de ESIPT.....	25
<b>Figura 14</b> – Possíveis formas emissivas do monoânion $\gamma$ .....	26
<b>Figura 15</b> – Variação de energia eletrônica <i>versus</i> o ângulo de torção do carboxilato para as formas (a) neutra, (b) monoaniônica e (c) dianiônica.....	28
<b>Figura 16</b> – Distorção no anel naftalênico, para a forma neutra da sonda $\delta$ .....	29
<b>Figura 17</b> – Plano do anel naftalênico para a sonda b em suas formas (a) monoaniônica e (b) dianiônica.....	30

<b>Figura 18</b> – Gráfico do rendimento quântico <i>versus</i> o ângulo entre o carboxilato e o anel.....	31
<b>Figura 19</b> – Variação da energia eletrônica total em função do estiramento da ligação O–H da hidroxila das formas (a) neutra e (b) monoaniônica.....	32

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Exemplos de $pK_a$ no estado excitado (Rohatgi-Mukherjee, 1992).....	13
<b>Tabela 2</b> – Valores de $pK_{a1}$ e $pK_{a2}$ dos ácidos hidróxi-naftóicos, a 25°C e $\mu=1$ (KCl). ..	21
<b>Tabela 3</b> – Ordem dos rendimentos quânticos e da rigidez da carboxila.....	30

## ÍNDICE DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Máximos de emissão.....	18
<b>Quadro 2</b> – Rendimentos quânticos de fluorescência das sondas.....	19
<b>Quadro 3</b> – Previsão do $pK_a^*$ pelo Ciclo de Förster.....	21
<b>Quadro 4</b> – Tempos de vida das sondas fluorescentes.....	23

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\alpha$ -HNA – Ácido 1-hidróxi-2-naftóico

$\beta$ -HNA – Ácido 2-hidróxi-1-naftóico

$\gamma$ -HNA – Ácido 3-hidróxi-2-naftóico

$\delta$ -HNA – Ácido 8-hidróxi-1-naftóico

$\phi$  – Rendimento quântico de fluorescência

$\tau$  – tempo de vida média

$\lambda_{\text{emss}}$  – Comprimento de onda de emissão máxima

$\lambda_{\text{exc}}$  – Comprimento de onda de excitação

$h\nu_{\text{ex}}$  – fóton de excitação

$h\nu_{\text{em}}$  – fóton emitido

$S_0$  – Estado eletrônico singlete fundamental relaxado

$S_1$  – Estado eletrônico singlete excitado relaxado



## RESUMO

A espectrometria de fluorescência está aumentando sua popularidade em muitos ramos das ciências químicas e biológicas, na análise de amostras contendo íons metálicos ou de compostos que apresentam significativa fluorescência. A melhor compreensão dos mecanismos e equilíbrios envolvidos na interação de sondas fluorescentes com o meio possibilita o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de detecção analítica, além de contribuir para o conhecimento geral do comportamento físico-químico de moléculas orgânicas no estado excitado.

Neste trabalho estudaram-se as características da fluorescência dos seguintes fluoróforos: ácido 1-hidróxi-2-naftóico, ácido 2-hidróxi-1-naftóico, ácido 3-hidróxi-2-naftóico e ácido 8-hidróxi-1-naftóico. Observa-se emissão fluorescente quase nula para este último.

Foram estudados também os tempos de vida das sondas. Cálculos computacionais mostraram que a estrutura mais estável do ácido 8-hidróxi-1-naftóico é muito distorcida, o que deve impedir o fenômeno de fluorescência. Observa-se também que o  $pK_{a2}$  do ácido 2-hidróxi-1-naftóico é baixo devido à inexistência de barreira no sentido de quebra da ligação de hidrogênio interna.

A energia de torção do carboxilato mostra relação com o rendimento quântico dos ácidos 1-hidróxi-2-naftóico e 2-hidróxi-1-naftóico. Para o ácido 3-hidróxi-2-naftóico, a transferência intramolecular do próton no estado excitado modifica a estrutura, e os cálculos realizados não são condizentes com a estrutura real. Para as formas dianiônicas, observa-se relação entre a distorção do carboxilato de um ângulo ideal de  $90^\circ$  e o rendimento quântico experimental.

## 1. INTRODUÇÃO

A emissão e absorção de luz por um átomo ou molécula é talvez o fenômeno mais importante e espetacular no universo. Ele ocorre quando um átomo ou molécula atravessa uma transição de estados causada pela sua interação com o campo eletromagnético. Como o campo eletromagnético não pode ser completamente eliminado de sistemas isolados (exceto em certos experimentos quânticos), nenhum átomo ou molécula está realmente isolado. Assim sendo, mesmo na ausência de um campo explicitamente aplicado, um sistema excitado pode espontaneamente emitir um fóton e relaxar a um estado de menor energia (Bittner, 2003).

A Fotoquímica trata de reações que são iniciadas por moléculas eletronicamente excitadas. Tais moléculas são produzidas pela absorção de radiação apropriada nas regiões visível e ultravioleta próximo do espectro. A Fotoquímica é básica para o mundo onde vivemos. Com o Sol como figura central, a própria origem da vida deve ter sido um ato fotoquímico. Na Terra primitiva, a radiação do Sol era a única fonte de energia (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

### 1.1 LEIS DA FOTOQUÍMICA

Fenômenos fotoquímicos começaram a ser estudados qualitativamente no início do século XIX e, pouco a pouco, foram estabelecidos os fundamentos dos estudos quantitativos. Assim, a *1ª lei da fotoquímica* foi descrita por Grotthus-Draper:

*“Somente a luz que é absorvida por um sistema pode causar mudanças químicas”.*

A probabilidade da absorção é descrita na Lei de Lambert-Beer. A Lei de Lambert estabelece que a fração de radiação incidente absorvida por um meio transparente é independente da intensidade da radiação incidente e que cada camada sucessiva do meio absorve uma fração igual de radiação incidente (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

A Lei de Beer estabelece que a quantidade de luz absorvida é proporcional ao número de moléculas excitadas pela radiação para uma determinada concentração  $c$  e pode ser expressa como:

$$\log \frac{I_0}{I} = A_m \cdot c \cdot l \quad (1)$$

onde:

$A_m$  é chamado de absorvidade molar e é uma função do comprimento de onda;

$c$  é a concentração é expressa em moles por litro;

$l$  é o comprimento ótico em cm;

$I_0$  é a intensidade incidente; e

$I$  é a intensidade transmitida (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

A 2ª lei da fotoquímica foi enunciada por Stark (1908) e mais tarde por Einstein (1912). É conhecida como Lei de Stark-Einstein:

*“Por cada quantum de luz absorvido por um sistema químico, apenas uma única molécula é ativada para realizar uma reação fotoquímica”.*

O trabalho subsequente de Warburg e Bodenstein (1912 –1915) esclareceu a relação entre absorção de fóton e mudança química. As moléculas que absorvem um fóton tornam-se “excitadas” fisicamente e, isto deve ser distinguido de tornar-se “quimicamente ativa” (Rohatgi-Mukherjee, 1992)

Moléculas excitadas podem perder a energia delas por caminhos não-químicos, ou alternativamente podem desencadear reações térmicas de grande rendimento químico. Para expressar a eficiência de uma reação fotoquímica, em termos da eficiência dos quantum absorvidos, o rendimento quântico  $\phi$ , é definido como:

$$\phi = \frac{\text{nº de moléculas que reagem por unidade de tempo}}{\text{nº de quanta absorvidos por unidade de tempo}} \quad (2)$$

O conceito de rendimento quântico pode ser estendido para qualquer ação química ou física seguida da absorção de luz. Então, pode-se encontrar uma forma de quantificar a partição dos quanta absorvidos dentro de um processo que inclui vários caminhos (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

## 1.2 EMISSÃO OU DISSIPAÇÃO DE ENERGIA POR MOLÉCULAS EXCITADAS

Existem dois mecanismos principais através dos quais as moléculas podem desprender-se do excesso de energia eletrônica que adquiriram como resultado da absorção de radiação. O primeiro deles depende da transferência de energia entre as moléculas que se chocam, ou ao menos estão muito próximas, e o decaimento ocorre através da liberação de energia térmica. Estes processos são descritos como *não-radiantes*, pois não ocorre a reemissão do fóton absorvido. O segundo mecanismo geral para a dissipação de energia compreende a emissão de radiação eletromagnética proveniente da molécula excitada. Nestes processos, ditos *radiantes*, são reconhecidos dois fenômenos: fluorescência, que em geral ocorre muito rapidamente, e fosforescência, que pode persistir muito tempo depois de que é cessada a formação de moléculas excitadas (Barrow, 1967; Lakowicz, 1983; Rohatgi-Mukherjee, 1992; MacCarthy, 2001).

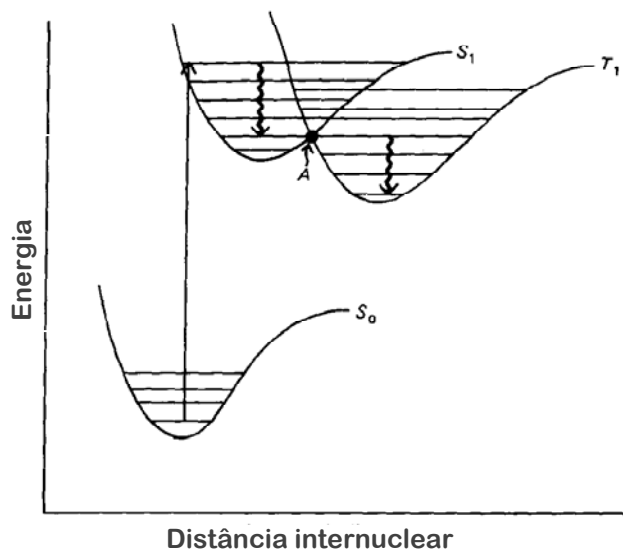
### 1.2.1 Processos não-radiantes de perda de energia no estado líquido

No estado líquido o conceito de colisões moleculares é menos direto que no caso de uma molécula de gás. O número de colisões de uma molécula de gás por segundo é obtido a partir da *teoria cinética-molecular dos gases*, onde para moléculas relativamente pequenas se calcula que, a 1 atm de pressão, uma molécula sofre uma colisão aproximadamente cada  $10^{-10}$  segundos.

Para o caso de líquidos, a frequência com que uma molécula se choca com outra, encontra-se na ordem de  $10^{13}$  vezes por segundo. Este valor corresponde a um tempo entre colisões de aproximadamente  $10^{-13}$  segundos, valor que parece razoável, devido à maior aproximação das moléculas em um líquido que em um gás a 1 atm. Entretanto, não existe razão para esperar que todos os choques sejam efetivos em termos de transferências de energia rotacional, vibracional e/ou eletrônica. O retorno por conversão interna ao menor estado vibracional geralmente leva  $10^{-12}$  segundos ou menos (Barrow, 1967; Lakowicz, 1983).

Há muitos casos nos quais as estruturas eletrônicas do estado fundamental e do estado excitado não são simétricas em termos de diagramas de energia versus distância. Nesta situação, as curvas de energia potencial se cortam entre si. Observa-se

que o caminho de desativação que é seguido diminui a energia da molécula originalmente excitada através de níveis de vibração do estado inicial excitado a um nível onde a energia potencial, do primeiro estado excitado, corta a do outro estado. Neste ponto de intersecção ambas ordenações eletrônicas possuem, dentro de uma geometria molecular específica, a mesma energia potencial.



**Figura 1.** Cruzamento de curvas potenciais (Cowan *et al.*, 1978).

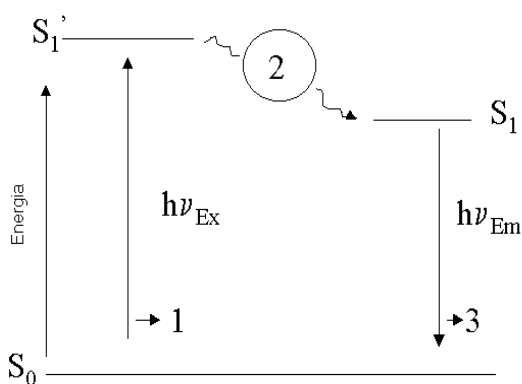
Nesse ponto particular do diagrama de energia, pode considerar-se como sendo relativamente fácil para uma determinada estrutura eletrônica mudar de uma das curvas para a outra, desde que seja uma mudança entre níveis de energia semelhantes de uma curva de potencial, para aquela que corresponde à outra série de níveis e, portanto, a outra curva de potencial. Este processo, conhecido como conversão interna, parece ser muito mais provável que outras mudanças que devem estar acompanhadas de uma grande transferência de energia. Assim, é por este processo de desativação vibracional e conversão interna pelo qual uma molécula promovida a um estado excitado, pode voltar a seu estado eletrônico de vibração fundamental inicial através de processos não radiantes.

Deve-se mencionar que, mesmo quando as curvas de energia potencial das diferentes estruturas eletrônicas se cortam, não é necessariamente fácil que aconteça uma mudança de estrutura eletrônica. Esta dificuldade é mais óbvia quando o número

de elétrons desemparelhados é diferente nas duas estruturas. Por exemplo, a conversão interna entre os estados singlete e triplete pode ocorrer, no entanto, não é tão rápida e fácil quanto a conversão que acontece entre estados eletrônicos com igual número de elétrons desemparelhados. O mecanismo pelo qual é realizada a inversão do spin de um elétron não é muito efetivo (Barrow, 1967; MacCarthy, 2001).

### 1.2.2 Emissão radiante por fluorescência

O processo de emissão de luz de sondas fluorescentes (fluoróforos) freqüentemente é ilustrado pelo diagrama de estado eletrônico, denominado diagrama de Jabłoński (Willart *et al.*, 1974; Miller, 1981; Lakowicz, 1983; Rohatgi-Mukherjee, 1992) cuja representação pode ser encontrada, em geral, de duas formas. A primeira, como é mostrado na **Figura 2**, onde o diagrama de Jabłoński, é apresentado de forma simplificada para explicar o processo de fluorescência, onde são discutidos estágios identificados como 1, 2 e 3 que correspondem a diferentes eventos.



**Figura 2.** Diagrama de Jabłoński simplificado.

#### Estágio 1: Excitação

Um fóton com energia  $h\nu_{ex}$  é absorvido pelo fluoróforo, criando um estado eletrônico excitado singlete ( $S_1'$ ). Este processo diferencia fluorescência de quimiluminescência, no qual o estado excitado é provocado por uma reação química.

### **Estágio 2: Tempo de vida do estado excitado ( $\tau$ )**

O estado excitado em uma molécula ocorre por um tempo finito (na faixa de picosegundos até microsegundos). Durante este tempo, o fluoróforo é submetido a mudanças conformacionais e a múltiplas interações com o meio. Estes processos possuem dois resultados importantes:

- A energia de  $S_1'$  é parcialmente dissipada, produzindo um estado excitado singlete relaxado  $S_1$ , do qual é originada a emissão fluorescente.
- Nem todas as moléculas inicialmente excitadas acabam retornando ao estado fundamental  $S_0$  pela emissão da fluorescência. Outros processos, como apagamento por colisão, cruzamento de sistemas internos e reações no estado excitado, podem dissipar a energia da molécula.

### **Estágio 3: Emissão fluorescente**

Um fóton de energia  $h\nu_{em}$  é emitido, devolvendo o fluoróforo ao estado fundamental  $S_0$ . Devido à dissipação de energia durante o tempo de vida  $\tau$  do estado excitado, a energia deste fóton é menor do que o fóton de excitação  $h\nu_{ex}$ . Esta diferença de energia é representada por  $(h\nu_{ex} - h\nu_{em})$  e é chamada de *deslocamento de Stokes*.

O *deslocamento de Stokes* é fundamental para a sensibilidade da técnica fluorescente porque permite que a emissão de fótons seja detectada com uma baixa emissão de fundo, já que os comprimentos de onda de excitação e emissão são significativamente diferentes. Na espectrofotometria de absorção, as medidas de absorvância ocorrem no mesmo comprimento de onda da luz incidente.

A **Figura 3** mostra o diagrama de Jabłoński completo, no qual está representado o diagrama esquemático dos níveis energéticos de uma molécula orgânica típica. Nas ordenadas representa-se a energia potencial dos diferentes níveis especificados e são mostradas as curvas de energia potencial em função da distância para as estruturas no estado fundamental e estados excitados singlete e tripleto.

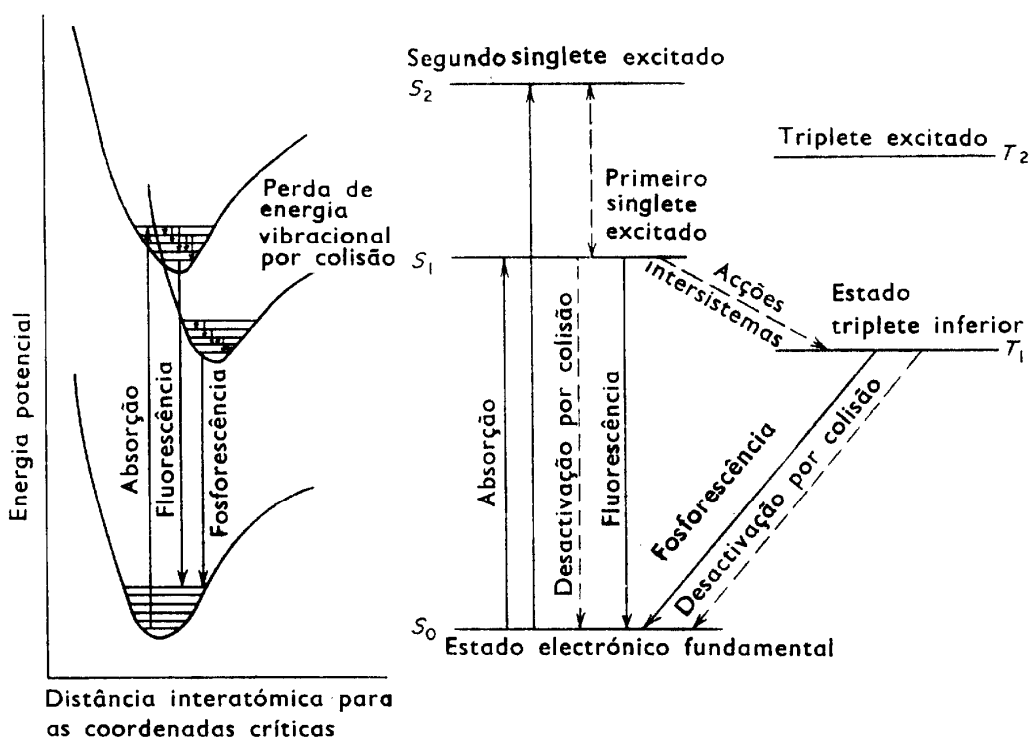


Figura 3. Diagrama de Jablonski completo.

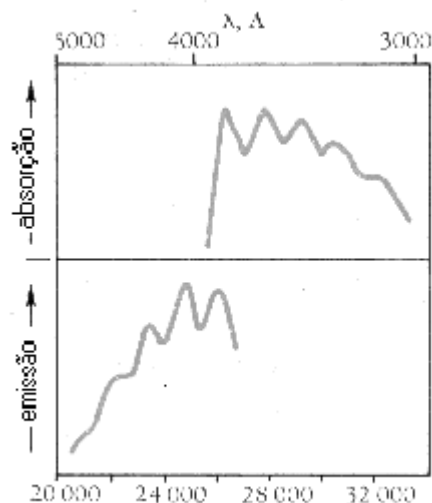
### 1.2.3 Espectro Fluorescente

Como princípio geral, de acordo com o deslocamento de Stokes, a energia da radiação emitida tem menos energia que a radiação absorvida. Isto conduz a uma banda de emissão com frequências menores (comprimento de onda maior) que a correspondente banda de absorção.

Uma situação similar acontece se a emissão ocorre de um dos estados eletrônicos excitados alcançados por conversão interna (Barrow, 1967; Willart *et al.*, 1974).

Os espectros de absorção e de fluorescência de uma sonda orgânica típica são mostrados na **Figura 4** e confirmam os resultados esperados, especialmente considerando os comprimentos de onda relativos à absorção e à emissão.





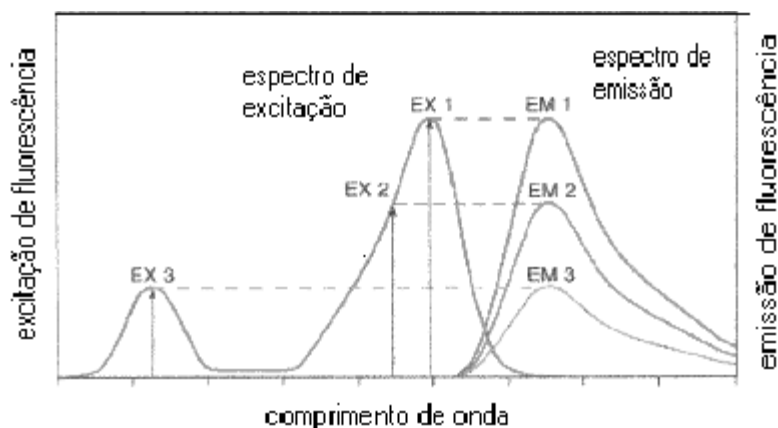
**Figura 4.** Absorção e fluorescência do antraceno.

É necessário que o retorno ao estado fundamental por processos não radiantes seja suficientemente lento para que o processo fluorescente consiga ter a possibilidade de ser competitivo. Da mesma forma que para os processos não radiantes, o processo radiante é afetado pelo número de elétrons desemparelhados dos estados envolvidos no processo de emissão. Ainda que não tenha sido feita nenhuma afirmação específica, está sendo suposto que o processo de emissão conecta dois estados com o mesmo número de elétrons desemparelhados, por exemplo, dois estados singletes. Tal emissão se conhece como emissão fluorescente, ou fluorescência e esta emissão ocorre de forma corrente com vidas médias relativamente curtas. Experimentalmente se encontram vidas médias para a emissão de fluorescência no intervalo de  $10^{-10}$  até perto de  $10^{-5}$  s.

Para uma molécula poliatômica em solução, ou seja, no caso de um fluoróforo em solução diluída, o espectro de excitação fluorescente será idêntico ao seu espectro de absorção (excetuando-se efeitos de filtro interno). Sob as mesmas condições, o espectro de emissão de fluorescência é independente do  $\lambda$  de excitação, devido à ocorrência da dissipação da energia de excitação durante o tempo de vida do estado excitado.

Assim, como é mostrado na **Figura 5**, a intensidade de emissão é apenas proporcional à intensidade experimentalmente observada no espectro de excitação

fluorescente no  $\lambda$  utilizado para realizar a excitação. Exceções à regra da imagem especular geralmente indicam um diferente arranjo geométrico dos núcleos no estado excitado (Lakowicz, 1983).



**Figura 5.** Excitação do fluoróforo em diferentes comprimentos de onda.

### 1.3 CARACTERÍSTICAS DOS FLUORÓFOROS

O fenômeno de emissão pode ocorrer de vários modos. Entretanto, os principais modos de caracterizar a fluorescência são o *tempo de vida* ( $\tau$ ), o comprimento máximo de emissão e o rendimento quântico de fluorescência ( $\phi$ ). Moléculas que podem fluorescer são chamadas de *fluoróforos*, em analogia aos cromóforos, e sua estrutura é um fator decisivo no comportamento emissivo.

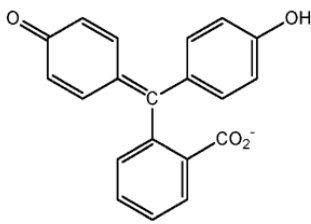
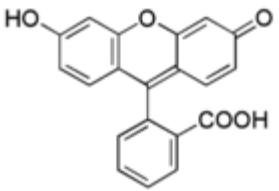
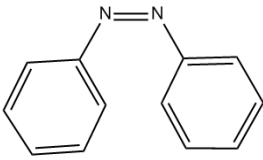
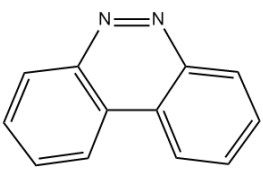
#### 1.3.1 Estrutura das sondas fluorescentes

Apesar de todas as moléculas serem capazes de absorver luz, a fluorescência não é observada para a maioria dos compostos. O fenômeno é observado geralmente em moléculas que têm uma estrutura rígida, sem substituintes fracamente acoplados pelos quais a energia vibracional pode fluir para fora do sistema. Esse mecanismo de desativação é tão eficiente que a maioria das moléculas não é fluorescente.

Alguns substituintes tendem a aumentar a fluorescência. Estes são chamados de *fluorocromos*, no mesmo sentido que os auxocromos. Em geral, estes são grupos doadores de elétrons, tais como  $-OH$  e  $-NH_2$ , que aumentam a probabilidade de

transição. Por outro lado, grupos retiradores de elétrons tendem a diminuir ou inibir completamente a emissão de fluorescência. Em solução aquosa diluída, a anilina é cerca de 40 vezes mais fluorescente que o benzeno, enquanto o ácido benzóico não fluoresce.

O exemplo clássico de fluorescência induzida pela rigidez do sistema é encontrado no par fenolftaleína-fluoresceína. A primeira não é fluorescente, enquanto a última, diferente apenas na presença de uma ponte de oxigênio entre dois anéis, é altamente fluorescente. Similarmente, o azobenzeno é não-fluorescente, enquanto o diazafenantreno é fluorescente.

 <p>Fenolftaleína (não-fluorescente)</p>	 <p>Fluoresceína (fluorescente)</p>
 <p>Azobenzeno (não-fluorescente)</p>	 <p>Diazafenantreno (fluorescente)</p>

**Figura 6.** Exemplos de tensão na estrutura dos fluoróforos.

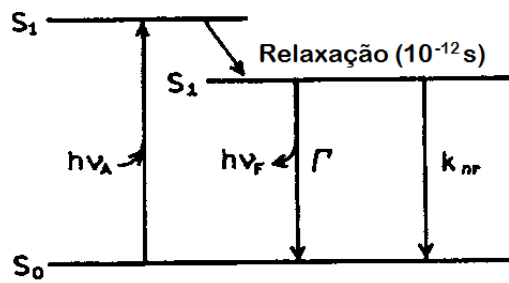
Ligações de hidrogênio na estrutura da molécula podem em alguns casos aumentar a fluorescência e, em outros, ajudar a dissipar a energia. Algumas o-hidróxi-benzofenonas são utilizadas como dissipadores de energia em plásticos e tecidos para evitar os efeitos danosos da incidência de luz (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

### 1.3.2 Tempos de vida e Rendimento quântico

O tempo de vida ( $\tau$ ) e rendimento quântico ( $\phi$ ) são talvez as características mais importantes de um fluoróforo. O rendimento quântico é o número de fótons emitidos em relação ao número de fótons absorvidos. Substâncias com os maiores rendimentos

quânticos, se aproximando da unidade, como as rodaminas, exibem as emissões mais fortes. O tempo de vida também é importante, já que ele determina o tempo disponível para o fluoróforo interagir com ou se difundir no meio, e afeta a informação vista na emissão.

O significado do rendimento quântico e do tempo de vida é melhor representado por um diagrama de Jabłoński simplificado (**Figura 7**). Nele, foca-se apenas nos processos responsáveis pelo retorno ao estado fundamental, a taxa emissiva ( $\Gamma$ ) e a taxa de decaimento não-radiativo ( $k_{nr}$ ).



**Figura 7.** Diagrama de Jabłoński para meios radiantes e não radiantes.

O rendimento quântico de fluorescência é a razão entre o número de fótons emitidos e os absorvidos. Os processos governados pelas constantes  $\Gamma$  e  $k_{nr}$  despovam o estado excitado (Lakowicz, 1983), sendo que a fração de fluoróforos que decaem através de emissão determinam o rendimento quântico  $\phi$ , de acordo com:

$$\phi = \frac{\Gamma}{\Gamma + k_{nr}} \quad (3)$$

ou, mais especificamente no caso da fluorescência:

$$\phi = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{SC}} \quad (4)$$

onde  $k_F$ ,  $k_{IC}$  e  $k_{SC}$  são, respectivamente, as taxas de emissão de fluorescência, de conversão interna e de cruzamento intersistemas (Klessinger & Michl, 1995).

O tempo de vida do estado excitado é definido pelo tempo médio que a molécula reside no estado excitado antes do retorno ao estado fundamental e, de acordo com o esquema da **Figura 7**, o tempo de vida é:

$$\tau = \frac{1}{\Gamma + k_{nr}} \quad (5)$$

Deve-se lembrar que a emissão é um fenômeno aleatório, e poucas moléculas emitem especificamente em  $t = \tau$ . O tempo de vida é um valor médio do tempo passado no estado energético. Para um decaimento exponencial simples, 63% das moléculas se desativaram antes de  $t = \tau$ , e 37% decaem em  $t > \tau$  (Lakowicz, 1983).

#### 1.4 REATIVIDADE NO ESTADO EXCITADO

Uma reação no estado excitado é um processo molecular que muda a estrutura do fluoróforo no estado excitado, e que ocorre subsequentemente à excitação. Tais reações ocorrem porque a absorção de luz interfere na distribuição eletrônica do fluoróforo, o que por sua vez muda suas propriedades físicas e químicas. O exemplo mais conhecido de uma reação no estado excitado é a do fenol, que em solução neutra perde o próton fenólico no estado excitado. Esta desprotonação ocorre mais facilmente no estado excitado porque os elétrons na hidroxila fenólica são transferidos para dentro do anel naftalênico, tornando o grupo mais ácido.

Reações no estado excitado não se restringem à processos de ionização. Muitos processos dinâmicos que afetam a fluorescência podem ser interpretados em termos de reações no estado excitado. Estes processos incluem relaxamento espectral, transferência de energia de ressonância e formação de excímeros. Reações no estado excitado ocorrem em sistemas bioquímicos, como a transferência de energia entre fluoróforos em ficobiliproteínas e durante a fotossíntese. Apesar da diversidade de fenômenos, processos no estado excitado exibem decaimentos característicos, que podem ser relacionados sem ambiguidade à presença destes processos.

Talvez o tipo predominante de reação no estado excitado seja o ganho ou perda de prótons (**Tabela 1**). O fato do fluoróforo ganhar ou perder prótons é determinado pela direção da mudança no  $pK_a$ . Se o  $pK_a$  diminui ( $pK_a^* < pK_a$ , onde o asterisco denota

o estado excitado), a sonda tende a perder um próton no estado excitado. Se, ao contrário, o  $pK_a^*$  aumenta, o fluoróforo pode abstrair um próton no estado excitado (Lakowicz, 1983).

**Tabela 1.** Exemplos de mudança de  $pK_a$  no estado excitado (Rohatgi-Mukherjee, 1992).

Espécie	$pK_a$	$pK_a^* (S_1)$
Fenol	10.0	4.0
2-Naftol	9.5	3.1
Ácido 2-naftóico	4.2	10-12
Ácido 1-naftóico	3.7	10-12
Íon acridínio	5.5	10.6

É possível prever razoavelmente o  $pK_a^*$  através do Ciclo de Förster, o qual utiliza os valores de energia das duas transições entre os níveis vibracionais mínimos (0-0), e permite fazer uma previsão da variação do  $pK_a$  entre os dois estados com a seguinte equação (Tolbert & Solntsev, 2002):

$$\Delta pK_a = pK_a - pK_a^* = \frac{hc(\nu_a - \nu_b)}{2,303RT} \quad (6)$$

Onde:

$\nu_a$  e  $\nu_b$  são as médias dos números de onda de absorção e emissão 0-0 para as formas protonada e desprotonada, respectivamente;

$h$  é a constante de Planck;

$c$  é a velocidade da luz;

$R$  é a constante dos gases; e

$T$  é a temperatura.

## 2. JUSTIFICATIVA

A espectrometria de fluorescência está aumentando sua popularidade em muitos ramos das ciências químicas e biológicas, e uma das aplicações mais importantes da fluorescência refere-se à utilização da mesma como método de detecção acoplado à cromatografia, tanto líquida de alta pressão (HPLC) como de íons (IC), na análise de amostras contendo íons metálicos ou de compostos que apresentam significativa fluorescência (Vargas *et al.*, 2005; Prat *et al.*, 1996; Soroka *et al.*, 1987; Prestes *et al.*, 2007). Os ácidos hidróxi-naftóicos, com uma fotoquímica complexa, também vêm sendo bastante utilizados como sondas (Sardar *et al.*, 2008; Rodríguez-Cáceres *et al.*, 2008; Tondo *et al.*, 2007). A melhor compreensão dos mecanismos e equilíbrios envolvidos na interação destas sondas fluorescentes com o meio possibilita o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de detecção analítica, além de contribuir para o conhecimento geral do comportamento físico-químico de moléculas orgânicas no estado excitado.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral**

O presente estudo determina os espectros de fluorescência de uma série de ácidos hidróxi-naftóicos, calcula suas estruturas moleculares e procura relações entre os mesmos.

#### **Estratégias Utilizadas**

De acordo com o objetivo geral, as estratégias específicas utilizadas neste trabalho são:

- Obter os espectros de emissão, excitação e os rendimentos quânticos de fluorescência das sondas.
- Obter os tempos de vida do estado singlete excitado das moléculas sob estudo em função do pH.
- Calcular a estrutura das diferentes formas dos ácidos no estado fundamental.
- Relacionar as estruturas com as energias emitidas pelas sondas.
- Calcular a energia envolvida na rotação da carboxila das sondas e no estiramento da ligação de hidrogênio.
- Relacionar os valores experimentais e teóricos.



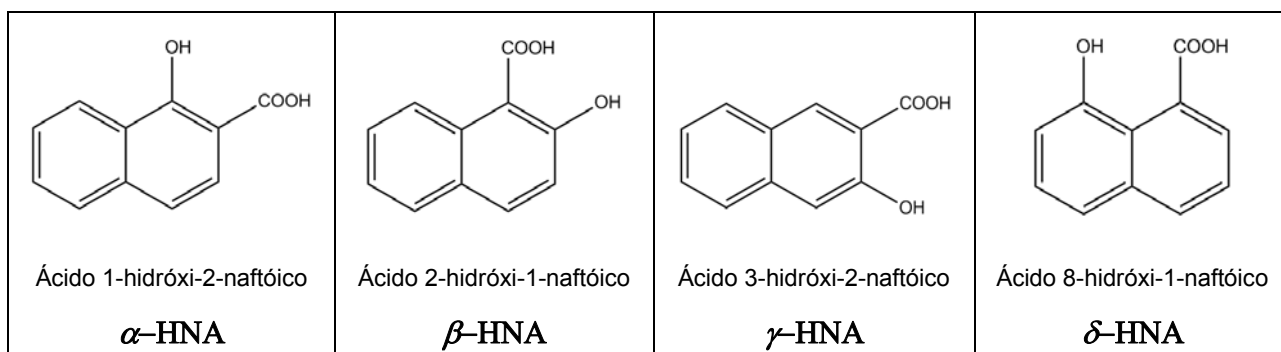
## 4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

### 4.1 REAGENTES

O ácido 8-hidróxi-1-naftóico foi sintetizado no Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais pelos alunos de doutorado Daniel Walker Tondo e Bruno Silveira de Souza. Os demais reagentes foram adquiridos comercialmente.

O padrão de rendimento quântico sulfato de quinina foi preparado com a dissolução de quinina anidra (Fluka, purum for fluorescence) em etanol e, em seguida, pela adição de uma pequena alíquota desta solução em ácido sulfúrico 1M.

Os ácidos escolhidos para estudo foram os hidróxi-naftóicos que possuem os dois radicais próximos o suficiente para interações entre estes. Os nomes técnicos dos ácidos foram abreviados utilizando uma letra grega para indicar a posição do grupo hidroxila:  $\alpha$ -HNA – ácido 1-hidróxi-2-naftóico;  $\beta$ -HNA – ácido 2-hidróxi-1-naftóico;  $\gamma$ -HNA – ácido 3-hidróxi-2-naftóico; e  $\delta$ -HNA – ácido 8-hidróxi-1-naftóico.



**Figura 8.** Ácidos utilizados no trabalho.

### 4.2 ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA

Os experimentos foram realizados em um espectrofotômetro de fluorescência (VARIAN, Cary Eclipse), com o auxílio de mais dois espectrofotômetros para registro dos espectros de absorção (FEMTO 800XI e HP8453). Soluções das sondas de absorvância  $0,25 \pm 0,01$  em determinado comprimento de onda, em vários pHs, foram excitadas nessa absorvância e comparadas com um espectro de sulfato de quinina

(preparado como descrito na seção anterior), de rendimento quântico reportado na literatura (Melhuish, 1960; Miller, 1981).

## 4.2 DETERMINAÇÃO DOS TEMPOS DE VIDA

Os primeiros experimentos de tempo de vida foram realizados no Laboratório de Fotoquímica do Instituto de Química da USP - campus de São Carlos (IQSC). O equipamento de tempo de vida de fluorescência (EasyLife, Optical Building Blocks Corporation) está equipado com fotodiodos de 370 e 280 nm, e utilizaram-se um espectrofotômetro (SHIMADZU, UV-2550) e um espectrofluorímetro (HITACHI, F-4500) como auxílio. Utilizou-se como padrão de IRF uma solução de sílica coloidal (Sigma-Aldrich, LUDOX AM-30). Os filtros do sistema detector permitiam a passagem de uma faixa de luz de 10nm.

Os experimentos de tempo de vida utilizando IRF (Impulse Response Function) de picossegundos foram realizados no Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa pelo grupo do Professor António Maçanita. Os tempos de vida foram medidos pela técnica de single photon counting utilizando um sistema Millenia Xs/Tsunami com 36 ps fwhh (picossegundos de largura à meia-altura).

## 4.3 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

Os cálculos teóricos foram realizados com o programa Gaussian 03 (G03) implementado para sistemas Linux. Para obtenção do mínimo global e construção da SEP foi utilizado o funcional de densidade híbrido B3LYP utilizando a função de base 6-31G, adicionando uma função difusa e uma função de polarização aos átomos de C e O [6-31+G(d)]. Em relação à obtenção da SEP, foi utilizada a opção *modred*. Dessa forma pode-se variar a geometria de entrada da molécula, definindo o número de vezes que determinado incremento será feito a um parâmetro estrutural. No presente trabalho um ângulo da estrutura molecular foi variado seguidamente, com incrementos de 10°. Do mesmo modo, uma ligação foi estirada com pequenos incrementos consecutivos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SEÇÃO EMPÍRICA

#### 5.1.1 Espectros de emissão

Os valores de comprimento de onda no máximo de emissão obtidos para as sondas em diferentes pHs estão no **Quadro 1**. Os valores entre parênteses são picos secundários, de menor intensidade de emissão. Em formas pouco fluorescentes, o erro na determinação do máximo é grande, pois aumenta-se a tensão no tubo fotomultiplicador, aumentando desvios na leitura.

**Quadro 1.** Máximos de emissão.

Forma	$\lambda_{exc}$ /nm	$\lambda_{emss}$ /nm			
		HCl 6M	pH 0	pH 5	pH 14
$\alpha$ -HNA	310	452	420	415	464
$\beta$ -HNA	297	404	399	411(350)	426
$\gamma$ -HNA	340	481 (383)	441 (393)	516 (400)	494
$\delta$ -HNA	310	460	419	426	419

O pico secundário em 400nm da forma  $\gamma$ -HNA em pH 5 tem intensidade comparável à do pico principal, tendo cerca de 25% da intensidade deste último. A forma do ácido  $\beta$ -HNA existente em pH 5 também demonstra dois picos de alta intensidade, com espectros de excitação diferentes, indicando a presença de duas espécies fluorescentes. O erro na leitura dos espectros da forma  $\delta$ -HNA é grande, devido à emissão praticamente nula desta sonda em todos os pHs estudados.

#### 5.1.2 Determinação dos rendimentos quânticos

O rendimento quântico de fluorescência é definido teoricamente pela **Equação 4**, sendo uma forma simplificada dessa equação definida do seguinte modo:

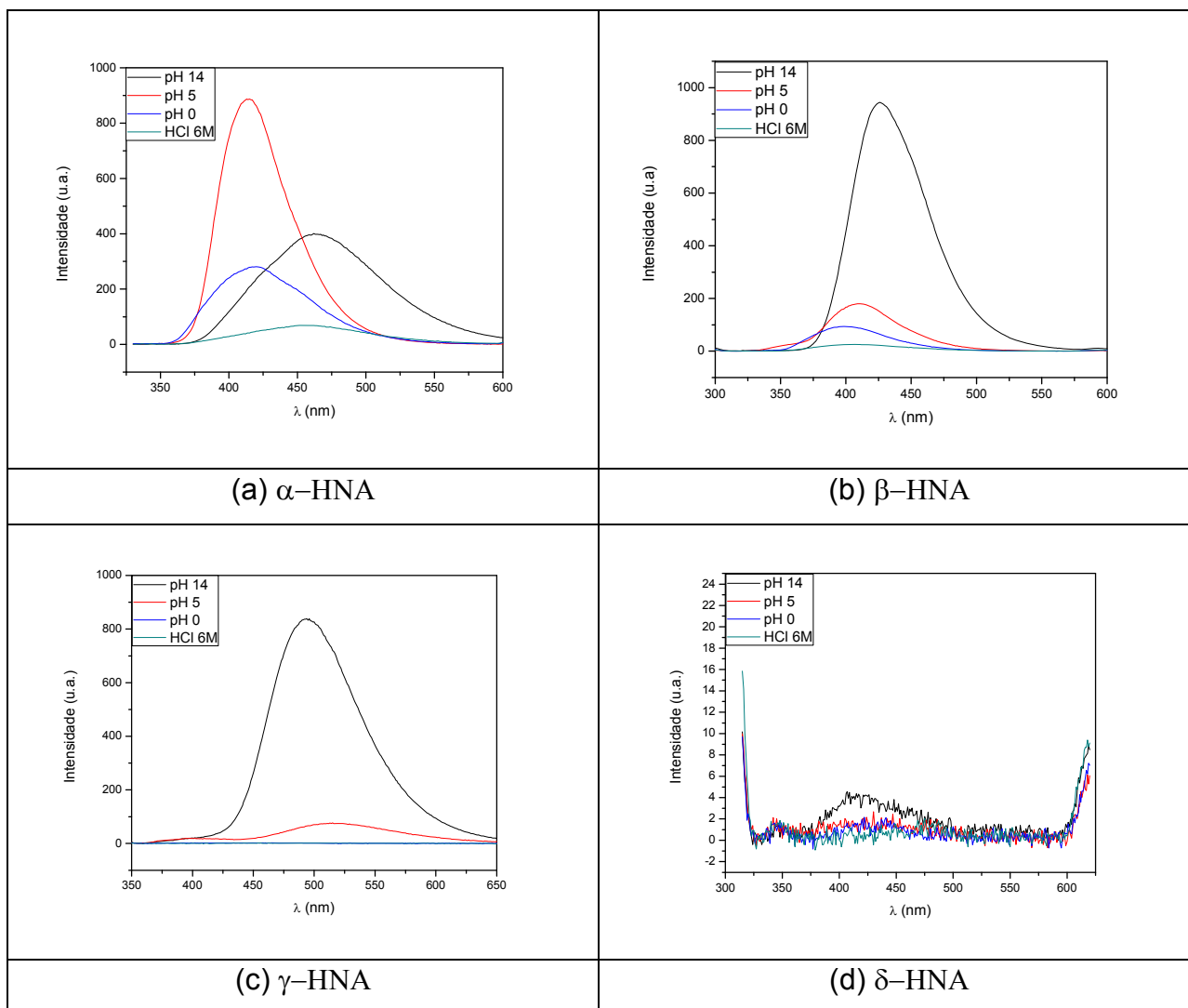
$$\phi = \frac{n^{\circ} \text{ de fótons emitidos}}{n^{\circ} \text{ de fótons absorvidos}} \quad (7)$$

Um método simples para a determinação do rendimento quântico de fluorescência é transformar o denominador da equação num valor constante, fixando a absorvância das soluções em um valor arbitrário. A absorvância escolhida foi de  $0,25 \pm 0,01$ , a qual não é suficientemente alta para criar um efeito de filtro interno significativo, nem baixa o suficiente para que variações na medição da absorvância causem perda na precisão da medida. O comprimento de excitação onde a absorvância foi fixada foi selecionado para que o coeficiente de extinção molar na região fosse semelhante para os vários pHs e, além disso, uma região onde a inclinação da curva de absorção fosse mais leve, evitando desvios na leitura. O numerador da equação é obtido através da integração da curva de emissão, que é proporcional ao número de fótons emitidos.

Os quatro ácidos foram investigados e comparados contra um padrão interno ( $\alpha$ -HNA em pH 5), e posteriormente comparados ao padrão de sulfato de quinina, de rendimento quântico conhecido, igual a 0,5457 para os parâmetros utilizados no experimento (Melhuish, 1960). Os valores de rendimento quântico de fluorescência ( $\phi$ ) e rendimento relativo ao padrão interno ( $\phi'$ ) estão descritos no **Quadro 2** e os espectros utilizados no cálculo, na **Figura 9**.

**Quadro 2.** Rendimentos quânticos de fluorescência das sondas.

Forma	$\lambda_{\text{exc}}$ /nm	HCl 6M		pH 0		pH 5		pH 14	
		$\phi'$	$\phi$	$\phi'$	$\phi$	$\phi'$	$\phi$	$\phi'$	$\phi$
$\alpha$ -HNA	310	0,132	0,018	0,426	0,058	1	0,137	0,766	0,105
$\beta$ -HNA	297	0,046	$6,3 \times 10^{-3}$	0,141	0,019	0,268	0,037	1,419	0,194
$\gamma$ -HNA	340	0,006	$8 \times 10^{-4}$	0,009	$1,2 \times 10^{-3}$	0,262	0,036	2,167	0,296
$\delta$ -HNA	310	0,002	$3 \times 10^{-4}$	0,003	$4 \times 10^{-4}$	0,004	$5 \times 10^{-4}$	0,007	0,001



**Figura 9.** Espectros de emissão de fluorescência das sondas (a)  $\alpha$ -HNA, (b)  $\beta$ -HNA, (c)  $\gamma$ -HNA e (d)  $\delta$ -HNA utilizados no cálculo do rendimento quântico.

Inicialmente, observam-se algumas tendências nos valores obtidos, das quais destaca-se que a sonda  $\delta$ -HNA não apresenta fluorescência considerável, com emissão não comparável a seus isômeros. Em geral, o rendimento quântico cresce com o pH, exceto para o ácido  $\alpha$ -HNA, entre os pHs 5 e 14 onde há um pequeno decréscimo do rendimento quântico observado. Além disso, o ácido  $\alpha$ -HNA possui valores de rendimento quântico anormalmente alto para valores baixos de pH.

### 5.1.3 Previsão dos $pK_a$ s do estado singlete excitado

A determinação dos  $pK_a$ s do estado fundamental dos ácidos estudados resultou nos valores expostos na **Tabela 2**. Chamou-se de  $pK_{a1}$  a constante que rege a perda do próton da carboxila no estado fundamental e de  $pK_{a2}$ , aquele que corresponde ao grupo hidroxila.

**Tabela 2.** Valores de  $pK_{a1}$  e  $pK_{a2}$  dos ácidos hidróxi-naftóicos, a 25°C e  $\mu=1$ (KCl).

Ácido	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$
$\alpha$	$2,48 \pm 0,01$	$13,02 \pm 0,02$
$\beta$	$2,69 \pm 0,05$	$9,83 \pm 0,02$
$\gamma$	$2,36 \pm 0,06$	$12,52 \pm 0,01$
$\delta$	$3,32 \pm 0,04$	$11,90 \pm 0,02$

A partir dos espectros de absorção e emissão, obtidos de acordo com os procedimentos descritos na **Seção 4.2**, é possível estimar a variação do  $pK_a$  no estado excitado através do ciclo de Förster. O **Quadro 3** mostra os valores calculados de variação de  $pK_a$  através dos espectros de absorção ( $\Delta pK_a^{ABS}$ ), emissão ( $\Delta pK_a^{EMSS}$ ) e da média dos números de onda obtidos ( $\Delta pK_a^V$ ). A partir destas variações calcula-se o  $pK_a$  do estado excitado ( $pK_a^*$ ).

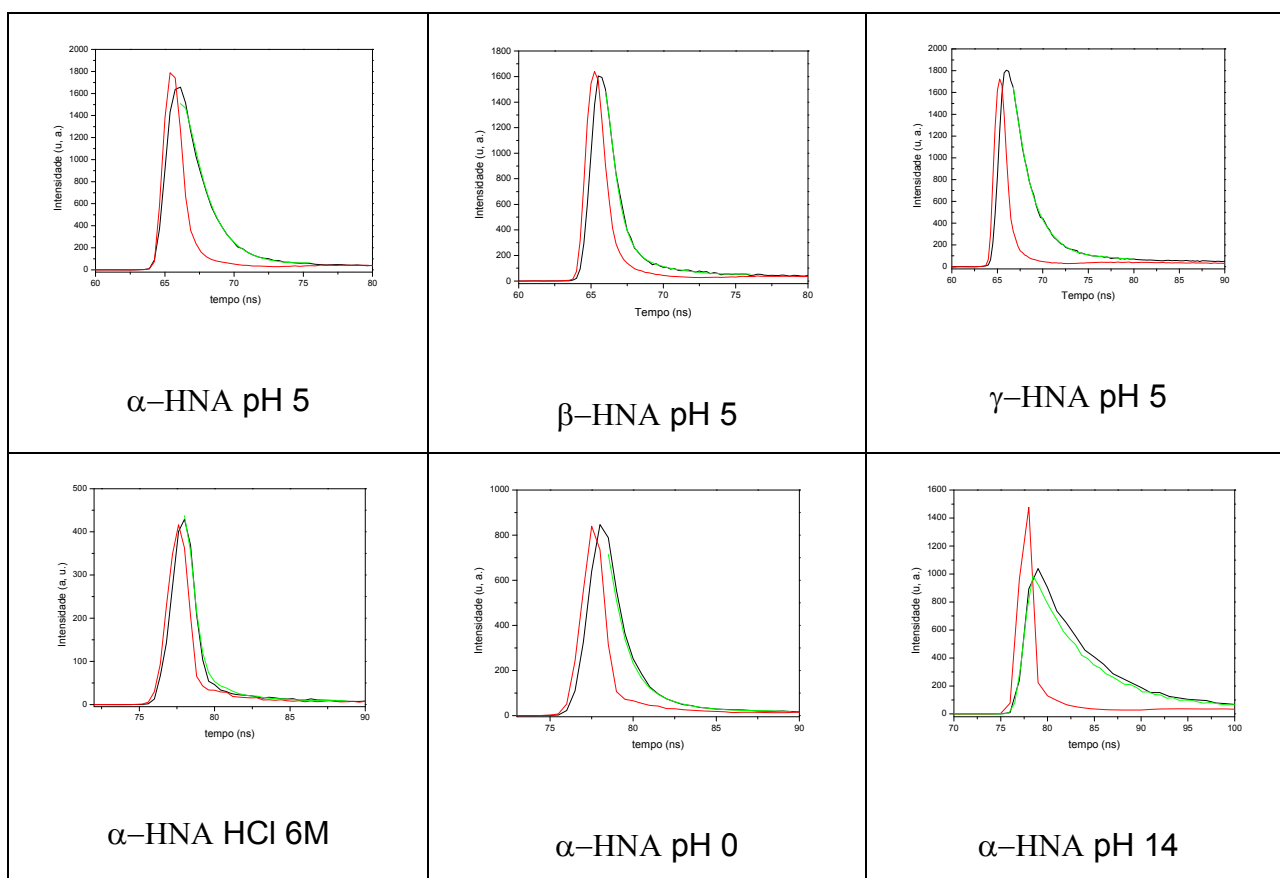
**Quadro 3.** Previsão do  $pK_a^*$  pelo Ciclo de Förster.

HNA	$\alpha$ -HNA		$\beta$ -HNA		$\gamma$ -HNA		$\delta$ -HNA	
	$pKa_1$	$pKa_2$	$pKa_1$	$pKa_2$	$pKa_1$	$pKa_2$	$pKa_1$	$pKa_2$
$\Delta pK_a^{ABS}$	-	-0,36	0,92	3,04	-1,49	0,51	0,40	2,44
$\Delta pK_a^{EMSS}$	-4,14	5,33	1,54	1,80	6,91	-1,81	-3,64	-0,82
$\Delta pK_a^V$	-	2,49	0,86	2,42	2,02	-0,65	-1,62	0,82
$pK_a$	2,48	13,02	2,69	9,83	2,36	12,52	3,32	11,90
$pK_a^*$	6,62	10,53	1,83	7,41	0,34	13,17	4,94	11,08

Os valores de  $pK_{a1}^*$  e  $pK_{a2}^*$  correspondem as constantes de dissociação das funções naftol e naftóico, respectivamente. As constantes calculadas para o estado excitado pelo ciclo de Förster correspondem aos valores esperados em termos dos efeitos eletrônicos.

#### 5.1.4 Tempos de vida do estado $S_1$

Conforme descrito anteriormente, o tempo de vida de fluorescência indica o tempo em que a sonda permanece no estado excitado, antes de decair, emitindo um fóton. Os primeiros valores obtidos, determinados no Laboratório de Fotoquímica do IQSC/USP, estão expostos na **Figura 10** e resumidos no **Quadro 4**.



**Figura 10.** Espectros de tempo de vida de fluorescência para as sondas em diferentes pHs.

**Quadro 4.** Tempos de vida das sondas fluorescentes.

	$\alpha$ -HNA				$\beta$ -HNA	$\gamma$ -HNA
pH	HCl 6M	0	5	14	5	5
$\tau$ (ns)	0,4233	0,8826	1,354	5,378	0,5092	1,449
Pre-exp	2,655	1,465	1,052	0,5291	2,519	1,184

Os tempos de vida de fluorescência apresentam decaimento exponencial de primeira ordem, compatível com a presença de uma única espécie fluorescente. No caso das formas  $\beta$ -HNA e  $\gamma$ -HNA, em pH 5, apresentam decaimento de segunda ordem, com a segunda espécie contribuindo com aproximadamente 10% em ambos os casos. Entretanto, essa quantidade detectada não é suficiente para assegurar a presença de outra espécie no meio experimental e seria necessário realizar experimentos com equipamentos de maior potência.

Os tempos de vida relativamente curtos diminuem a possibilidade de reações no estado excitado, dada a menor permanência dos reagentes no estado reativo. Em geral, para moléculas com tempos de vida intrinsecamente curtos, caminhos não-radiantes têm menor chance de serem cursados. Neste caso, a estrutura da molécula no estado excitado torna-se um fator determinante no valor final de rendimento quântico de fluorescência. Alternativamente, quando o tempo de vida curto é causado por reações no estado excitado e supressão estática ou dinâmica, os rendimentos não são diretamente – ou, pelo menos, não exclusivamente – relacionados à estrutura vibracional da molécula excitada.

Para as amostras em HCl 6M e pH 0, os baixos tempos de vida podem ser relacionados à alta concentração de íon cloreto, um conhecido apagador colisional de fluorescência (Lakowicz, 1983). A alta concentração diminui a possibilidade de difusão livre da molécula excitada, diminuindo assim o tempo de vida desta.

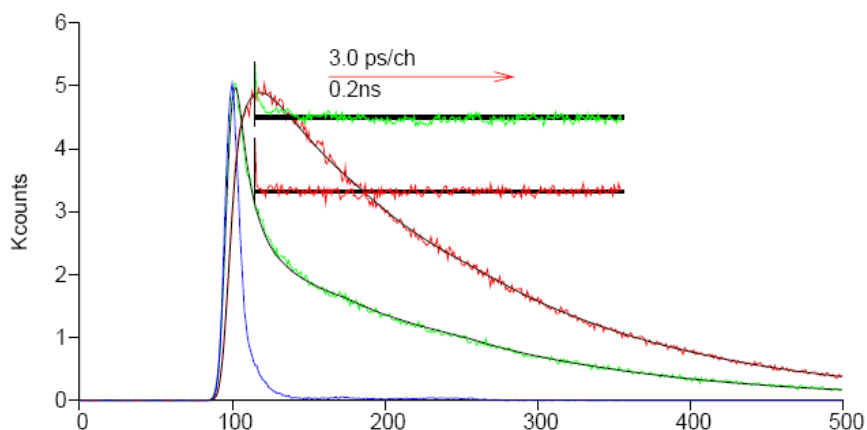


### 5.1.5 Tempos de vida com IRF de picossegundos

Para tentar observar as reações de transferência de prótons nas moléculas excitadas, foram conduzidos na Universidade Técnica de Lisboa experimentos de tempo de vida média com IRF de picossegundos, para o ácido  $\alpha$ -HNA. Esse menor tempo de geração do pulso permite que se observem reações e respostas de moléculas com tempos de vida muito curtos. No caso sob estudo, pretende-se ver as moléculas excitadas antes da abstração de próton, ou seja, na mesma forma que no estado fundamental.

O dado mais relevante observado é a presença de duas espécies diferentes em concentrações de 3 e 6 mol L<sup>-1</sup> de HClO<sub>4</sub> (**Figura 11**). Observa-se inicialmente o aparecimento de uma espécie emissiva e, em seguida, o desaparecimento desta primeira espécie e o surgimento de uma segunda, produto de uma reação de estado excitado da anterior. Supõe-se que a primeira seja a forma neutra excitada e a segunda, uma forma catiônica, que só consegue abstrair prótons do meio no estado excitado, visto que o pK<sub>a</sub> desta espécie no estado fundamental é muito baixo.

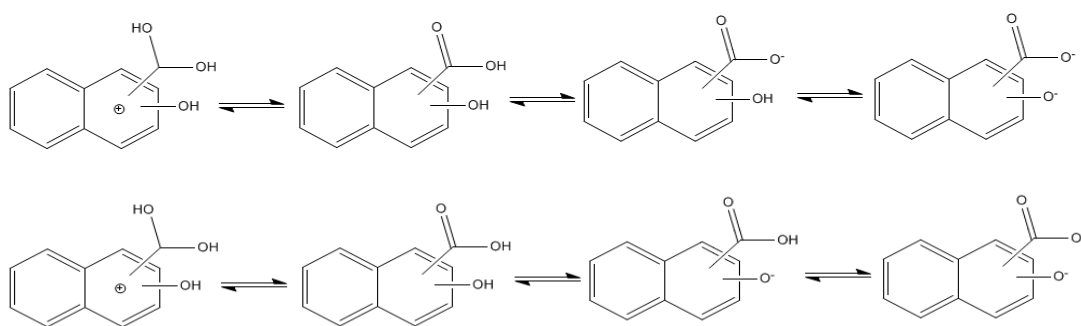
Os tempos de vida lidos são praticamente os mesmos que os observados com a técnica anterior. Não se observa troca de prótons em pH 0, 4, 5 e 14.



**Figura 11.** Espectro resolvido no tempo de emissão da sonda  $\alpha$  em HClO<sub>4</sub> 6M.

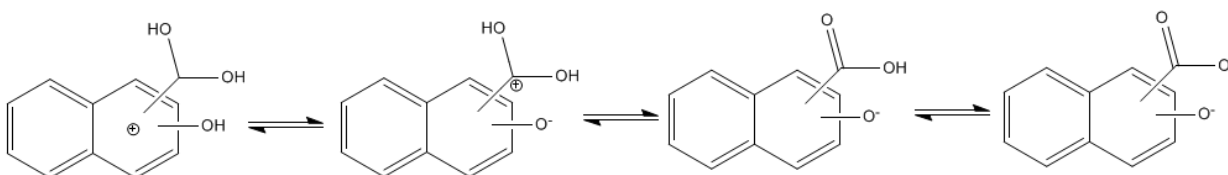
### 5.1.6 Equilíbrios no estado excitado

Os dois valores de  $pK_a$ s calculados para o estado excitado provavelmente não correspondem aos mesmos prótons dos valores de  $pK_a$  do estado fundamental. Encontra-se reportado em literatura que o  $pK_a$  de naftóis cai por volta de 7 unidades e o de ácidos naftóicos sobe 7 unidades (Mukherjee, 1992). Pensa-se, portanto, que o  $pK_a^*$  mais baixo corresponde à desprotonação da hidroxila e, o mais alto, à da carboxila.



**Figura 12.** Equilíbrio de dissociação dos ácidos no estado fundamental (acima) e uma possibilidade no estado excitado (abaixo).

Outra possibilidade, descrita na literatura para o ácido salicílico e derivados, é a de que os dois prótons móveis observados acima de pH 0 são provenientes da carboxila e a hidroxila continua desprotonada (Weller, 1952). Tal mecanismo é conhecido como ESIPT – Excited State Intramolecular Proton Exchange e ocorre em tempos extremamente rápidos, na ordem de femtossegundos (Herek, 1992; Douhal, 1996). A densidade do orbital LUMO é muito maior sobre a carboxila que no orbital HOMO, facilitando a protonação desta. O contrário é observado na hidroxila aromática, em que a baixa densidade eletrônica estabiliza a formação do fenolato.



**Figura 13.** Desprotonação por mecanismo de ESIPT.

A transferência do hidrogênio pode se dar tanto com formação do zwitteríon, sendo chamada de transferência de próton, ou de um tautômero ceto, sendo chamada de transferência de átomo de hidrogênio, já que não envolve a criação de carga formal sobre nenhum átomo (Douhal, 1996).

Supõe-se que os equilíbrios envolvidos na protonação da sonda  $\gamma$  ocorrem por ESIPT. A emissão deste ácido ocorre com deslocamento de Stokes alto, uma das principais características do mecanismo de troca interna. Além disso, observam-se dois tipos de emissão nas formas protonadas da sonda, uma de baixa e uma de alta frequência. A de alta frequência corresponderia, em pH 5, à estrutura A e a de baixa frequência, à estrutura A<sup>1</sup>.



**Figura 14.** Possíveis formas emissivas do monoânion  $\gamma$ -HNA.

A conversão incompleta, observada pela existência das duas formas no estado excitado, pode ser causada pela interação da estrutura A com hidroxilas livres em solução, impedindo a troca de próton intramolecular. Esta teoria é corroborada por evidências em literatura (Kovi & Schulman, 1973). É importante notar que a presença das duas formas também prejudica a aplicação do Ciclo de Förster para cálculo direto dos valores de  $pK_a^*$ .

No caso do ácido  $\beta$ -HNA, o deslocamento de Stokes não indica a ocorrência de ESIPT. A não-ocorrência de troca intramolecular é descrita em literatura para os ácidos  $\alpha$ -HNA e  $\beta$ -HNA (Mishra *et al.*, 2005), porém continua sendo um ponto controverso. Além disso, uma titulação acompanhada simultaneamente pelos máximos de emissão e excitação da sonda resulta no mesmo  $pK_a$  pelos dois métodos, demonstrando que a troca de prótons com o solvente é estática (i.e. lenta demais para competir com a

fluorescência para a desativação do estado excitado). A definição deste equilíbrio necessita, portanto, do auxílio dos cálculos teóricos, descritos na próxima seção.

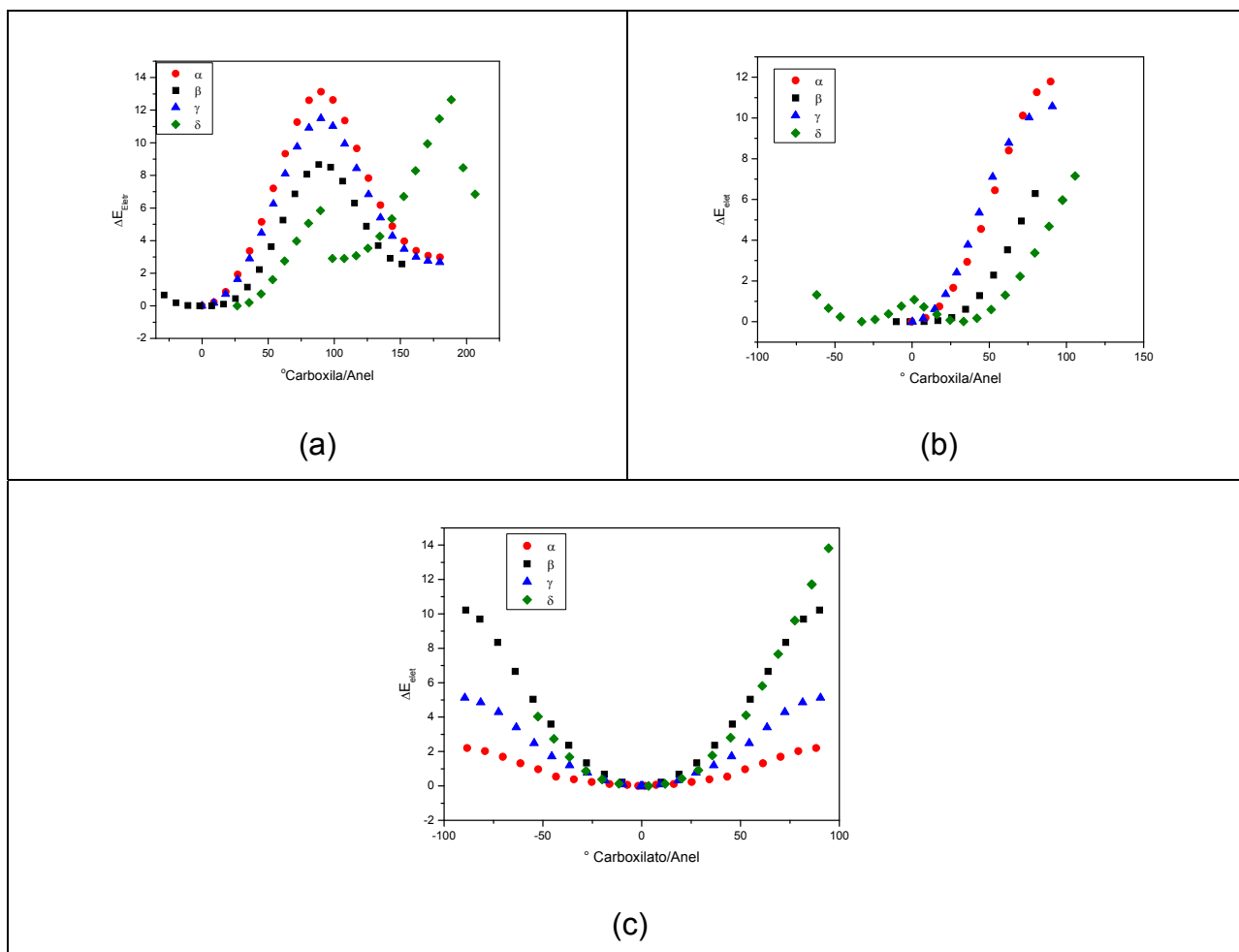
## 5.2 CÁLCULOS COMPUTACIONAIS

### 5.2.1 Cálculo da energia das estruturas no estado fundamental

Para estimar a rigidez da estrutura das moléculas sob estudo, calculou-se a energia total destas para várias rotações da carboxila em relação ao plano do anel. Uma alta energia de rotação indicaria uma forte coesão entre os átomos envolvidos na ligação de hidrogênio, diminuindo a possibilidade de vibrações isoladas destas frações da molécula. Vibrações independentes de partes da molécula ajudariam a dissipar a energia absorvida, diminuindo o rendimento quântico e, em casos extremos, apagando completamente a fluorescência.

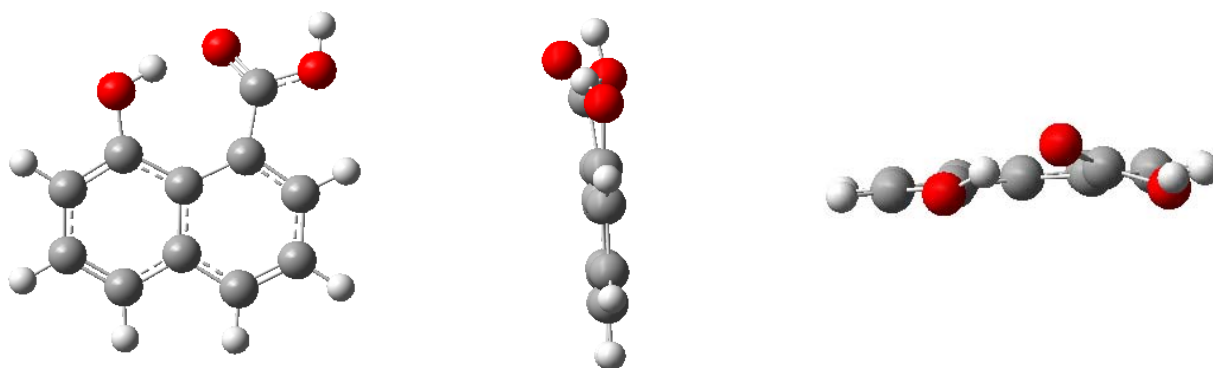
Os valores de energias obtidas em função do ângulo de rotação do carboxilato no estado fundamental estão na **Figura 15**.

Analizando inicialmente a sonda não-fluorescente,  $\delta$ -HNA, observa-se que a curva de energia total para a forma neutra apresenta variações bruscas, o que indica impedimento estérico no sentido da rotação, que leva a um rearranjo da molécula. No caso do monoânion e da forma neutra, ele apresenta relativa liberdade rotacional, o que poderia causar a perda de fluorescência por liberdade vibracional das partes isoladas. Entretanto, no caso do diânion, ele apresenta a maior rigidez dentre as sondas e, mesmo assim, é muito pouco fluorescente.



**Figura 15.** Variação de energia eletrônica *versus* o ângulo de torção do carboxilato para as formas (a) neutra, (b) monoaniônica e (c) dianiônica.

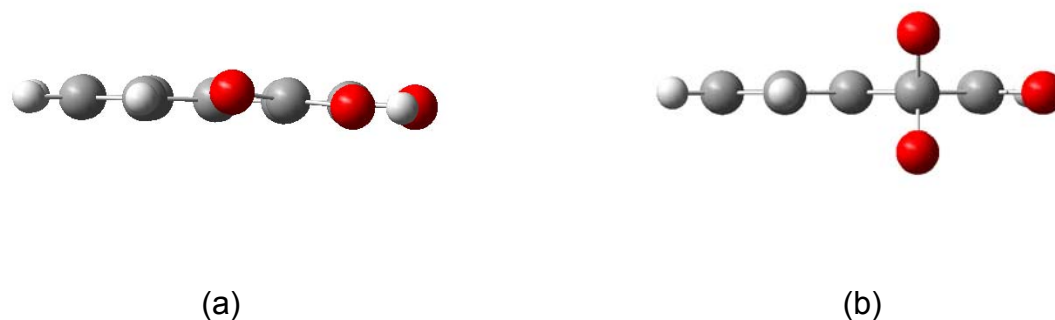
Apesar de não ser aparente à primeira vista, a posição 1,8 do naftaleno é a que mais aproxima os radicais. Assim sendo, observa-se na estrutura de energia mínima que a ponte de hidrogênio formada entre a hidroxila e a carboxila acaba distorcendo a estrutura naftalênica, com esta esticando-se próxima aos grupos e comprimindo-se no outro extremo (**Figura 16**). Esta observação leva a crer que a baixa – ou nula – fluorescência desta sonda é causada pela distorção do anel em uma estrutura não-planar, e não pela alta liberdade de rotação dos radicais ligados. Além disso, a ponte de hidrogênio forma um anel de 7 membros, que não deve conferir considerável planaridade e rigidez ao sistema, necessárias para o fenômeno da fluorescência.



**Figura 16** Distorção no anel naftalênico, para a forma neutra da sonda  $\delta$ -HNA.

Apesar de grande parte desta distorção desaparecer na estrutura mínima do diânion, os radicais continuam em posições afastadas, com ângulos C-C-O diferentes de  $120^\circ$  e com o carboxilato perpendicular ao plano do anel. Estes ângulos dificultam a doação de carga para o anel por ressonância, um dos fatores que mais contribui para o rendimento quântico da forma dianiônica dos ácidos. A rotação do carboxilato também distorce muito o anel, diminuindo a possibilidade de transição eletrônica radiante.

Um outro valor observado anteriormente que pode ser relacionado à estrutura do anel é o valor baixo do segundo  $pK_a$  do ácido  $\beta$ -HNA. Na forma monoaniônica, o anel apresenta-se ligeiramente distorcido, como se observa na **Figura 17**. A formação da ligação de hidrogênio interna empurra um oxigênio da carboxila na direção do hidrogênio da posição 8, e estes dois se repelem, tensionando o anel. Essa situação desaparece na forma dianiônica, o que contribui para a estabilização desta forma, dada a melhor sobreposição dos orbitais  $\pi$  no esqueleto aromático. Observa-se que a forma  $\beta$ -HNA tem uma energia muito maior no monoânion que a sonda  $\alpha$ -HNA, enquanto os diânions têm praticamente a mesma energia.



**Figura 17.** Plano do anel naftalênico para a sonda  $\beta$ -HNA em suas formas (a) monoaniônica e (b) dianiônica.

Como o rendimento quântico é relacionado à rigidez da molécula, relacionamos a energia de rotação do carboxilato ao rendimento quântico obtido experimentalmente. Observa-se que os ácidos fluorescentes, em suas formas neutras, apresentam o aumento de energia na seguinte ordem crescente:  $\beta$ -HNA,  $\gamma$ -HNA e  $\alpha$ -HNA. Já o rendimento quântico em pH 0, onde se espera encontrar a correspondente forma neutra, se organiza na ordem, também crescente:  $\gamma$ -HNA,  $\beta$ -HNA e  $\alpha$ -HNA (vide **Quadro 2**). A sonda  $\gamma$ -HNA praticamente não é fluorescente em nenhum pH, sendo, portanto, excluída desta seção.

Já em pH 5, onde se espera encontrar a forma monoaniônica, os rendimentos experimentais se dão do seguinte modo:  $\gamma$ -HNA,  $\beta$ -HNA e  $\alpha$ -HNA. Os cálculos, por sua vez, nos mostram a liberdade rotacional diminuindo na seguinte ordem:  $\beta$ -HNA,  $\alpha$ -HNA e  $\gamma$ -HNA.

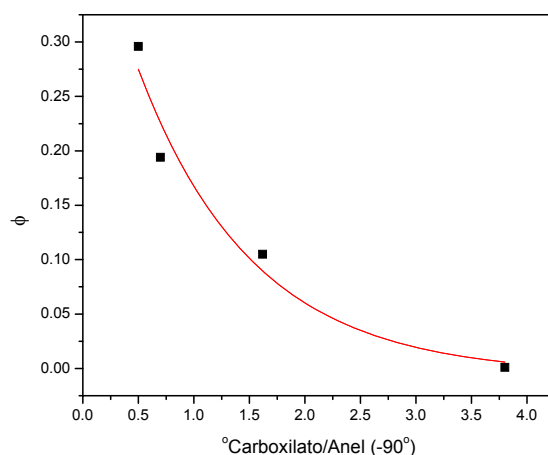
Em pH 14, observam-se os rendimentos crescendo na ordem:  $\alpha$ -HNA,  $\beta$ -HNA e  $\gamma$ -HNA. Mais uma vez, esta ordem não é observada teoricamente. Os vales energéticos crescem em profundidade no sentido:  $\alpha$ -HNA,  $\gamma$ -HNA e  $\beta$ -HNA.

**Tabela 3.** Ordem dos rendimentos quânticos e da rigidez da carboxila.

Forma	Ordem calculada	Ordem empírica
Neutra / pH 0	$\beta < \gamma < \alpha$	$\gamma < \beta < \alpha$
Monoaniônica / pH 5	$\beta < \alpha < \gamma$	$\gamma < \beta < \alpha$
Dianiônica / pH 14	$\alpha < \gamma < \beta$	$\alpha < \beta < \gamma$

Excluindo-se a sonda  $\gamma$ , é possível relacionar razoavelmente a profundidade do poço energético com a perda de energia por meios não radiantes. Este fenômeno deve ser causado pela variação na estrutura causada pela troca de próton intramolecular que ocorre na sonda (Mishra *et al.*, 2001), invalidando os cálculos feitos para o estado fundamental. Tomando-se apenas os ácidos  $\alpha$  e  $\beta$ , de estrutura muito similar, observa-se que a barreira energética para a torção da carboxila, causada pela interação desta com o hidrogênio fenólico, relaciona-se com a diminuição da perda de energia por processos não radiantes e, conseqüentemente, o aumento da fluorescência.

Um fato interessante, observado para as formas dianiônicas, é a relação entre o ângulo carboxilato-anel e o rendimento quântico. Observa-se que quanto maior o desvio de um valor ideal de  $90^\circ$ , menor a intensidade da fluorescência. A **Figura 18** demonstra esta relação.



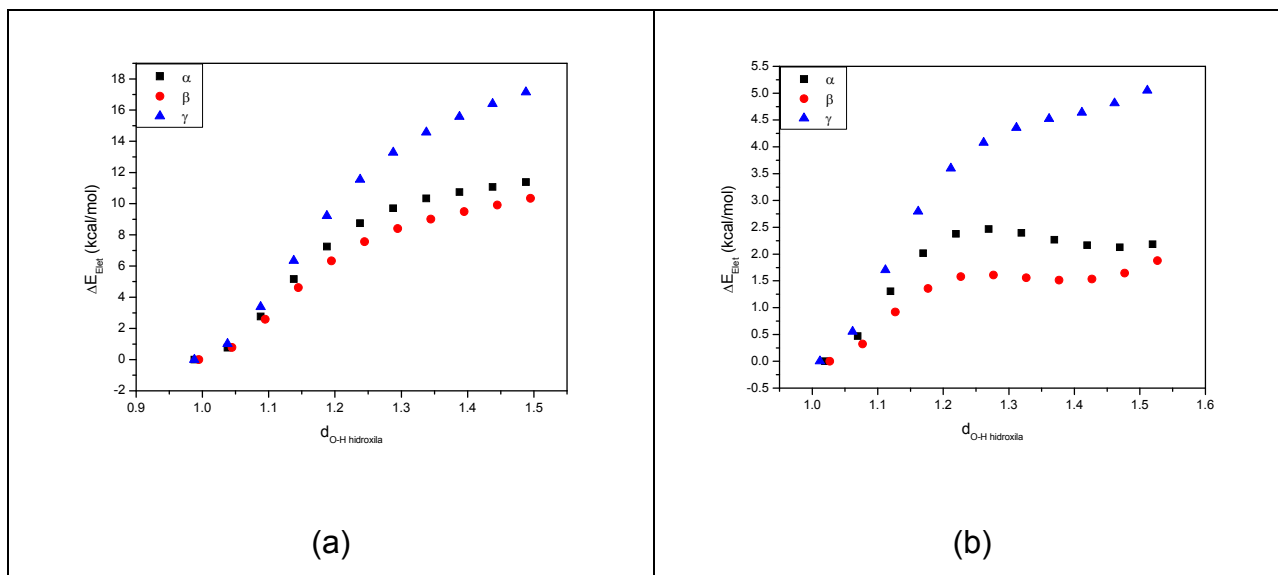
**Figura 18.** Gráfico do rendimento quântico *versus* o ângulo entre o carboxilato e o anel.

Uma possível explicação é a melhor ressonância entre o carboxilato e o anel, aumentando a rigidez na estrutura e a densidade eletrônica no anel, um fator que sabidamente aumenta a fluorescência das moléculas aromáticas (Rohatgi-Mukherjee, 1992).



### 5.2.2 Estiramento da ligação O–H fenólica

Para determinar a força da ligação de hidrogênio nos ácidos hidróxi-naftóicos, foi calculada a energia para estiramentos consecutivos da ligação O–H na hidroxila. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 19**.



**Figura 19.** Variação da energia eletrônica total em função do estiramento da ligação O–H da hidroxila das formas (a) neutra e (b) monoaniônica.

A baixa variação de energia para o monoânion do ácido  $\beta$  é um ponto a favor da teoria da troca intramolecular de próton nesta espécie, levando aos dois picos de emissão vistos em pH 5. À baixa energia para a transição do próton entre os dois espaços corresponderia um deslocamento de Stokes atípico para ES IPT, visto que este é causado principalmente pela diferença de energia entre as duas posições do próton no estado excitado.

Pelo mesmo raciocínio, se esperaria um maior deslocamento de Stokes para a sonda, dado que esta apresenta as maiores energias de deslocamento do próton. De fato, isto é observado no **Quadro 1**, onde fica demonstrado que o ácido  $\gamma$  tem os maiores comprimentos de emissão.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesse trabalho pode-se concluir que:

(i) Exceto a sonda  $\delta$ -HNA, todas são fluorescentes na maioria dos pHs. Observa-se nos cálculos conduzidos que a sonda  $\delta$ -HNA tem a estrutura do anel mais distorcida, o que provavelmente causa a perda de fluorescência. A sonda  $\gamma$ -HNA em pHs ácidos é pouco fluorescente. Em geral, o rendimento quântico cresce com o pH, exceto para o ácido  $\alpha$ -HNA, onde entre os pHs 5 e 14 onde há um pequeno decréscimo do rendimento quântico observado. O ácido  $\alpha$ -HNA possui valores de rendimento quântico anormalmente alto para valores baixos de pH.

(ii) As mudanças espectrais permitem calcular as constantes de dissociação dos estados excitados e os valores calculados pelo ciclo de Förster são consistentes com os efeitos eletrônicos esperados.

(iii) A energia de rotação da carboxila para o monoânion da sonda  $\beta$ -HNA explica a causa do segundo pKa tão baixo no estado fundamental. Não existe barreira para a rotação do carboxilato e, conseqüentemente, da quebra da ligação de hidrogênio.

(iv) Foi detectada uma transferência de próton no estado excitado (ESPT) para a sonda  $\alpha$ -HNA e no restante dos casos, provavelmente há transferências de prótons internas no estado excitado, que não são detectadas na região de nano- ou de picosegundos. A tensão calculada para o movimento da carboxila/carboxilato relaciona-se bem com os rendimentos quânticos observados para as sondas  $\alpha$ -HNA e  $\beta$ -HNA. A sonda  $\gamma$ -HNA sofre reação de ESIPT e sua estrutura no estado excitado deve ser consideravelmente diferente da do estado fundamental, restringindo a relação estrutura-rendimento quântico.

(v) O estiramento da ligação de hidrogênio, demonstrando a diferença de energia entre as estruturas fenólica e carboxílica, demonstra que a ocorrência de ESIPT deve acarretar uma diferença baixa de energia para o ácido  $\beta$ -HNA, o que observa-se empiricamente. Tal cálculo fortalece a teoria de ocorrência de transferência interna para o ácido  $\beta$ -HNA, fator observado nos espectros de emissão.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROW, G. M. *Estructuras de las moléculas*. Barcelona: Reverté, **1967**.

BITTNER, E.R. *Lecture Notes on Quantum Chemistry*, [s.l.]: University of Houston, **2003**.

COWAN, D.O.; DRISKO, R.L. *Elements of Organic Photochemistry*. New York Plenum Press, **1978**.

DOUHAL, A.; LAHMANI, F.; ZEWAİL, A.H. *Chem. Phys.* 207, **1996**, 477-498.

HEREK, J.L.; PEDERSEN, S.; BAIRARES, L.; ZEWAİL, A.H. *J. Phys. Chem.* 97 (12), **1992**, 9046-9061.

KLESSINGER, M.; MICHL, J. *Excited States and Photochemistry of Organic Molecules*. New York : VCH Publishers, **1995**.

KOVI, P.J.; SCHULMAN, S.G. *Anal. Chem.* **1973**, 45, 6, 989-991.

LAKOWICZ, J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, **1983**.

MACCARTHY, A. *Methods of Analysis and Detection*. Inglaterra: Cambridge University Press, **2001**.

MELHUISH, W.H. *J. Phys. Chem.*, 65, **1960**, 229-235.

MILLER, J. N. (Ed.) *Standards in Fluorescence Spectrometry*. London : Chapman & Hall, **1981**.

MISHRA, H.; MAHESHWARY, S.; TRIPATHI, H.B.; SATHYAMURTHY, N. *J. Phys. Chem. A*, 109, **2005**, 2746-2754.

MISHRA, H.; JOSHI, H.C.; TRIPATHI, H.B.; MAKESHWARY, S.; SATHYAMURTHY, N.; PANDA, M.; CHANDRASEKHAR, J. *J. Photochem. Photobio., A*, **2001**, 139, 23-36.

PRAT, M.D.; COMPAÑÓ, R.; GRANADOS, M.; MIRALLES, E. *J. Chromatogr., A*, 746, **1996**, 239-245.

PRESTES, O.D.; PRESTA, M.A.; KOLBERG, D.I.S.; ZANELLA, R.; ROSSATO, S.B.; PENNA, N.G.; HECKTHEUER, L.H.R. *Quim. Nova*, v.30, No. 1, **2007**, 18-21.

RODRÍGUEZ-CÁCERES, M.I.; AGBARIA, R.A.; LUNA, U.J.; WHITE, S.; WARNER, I.M. *Spectrochim. Acta Part A*, doi:10.1016/j.saa.2008.02.011, **2008**.

ROHATGI-MUKHERJEE, K.K. *Fundamentals of Photochemistry*, New Delhi: New Age International, **1992**.

SARDAR, P.S.; SAMANTA, S.; MAITY, S.S.; DASGUPTA, S.; GHOSH, S. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 3451-3461.

SOROKA, K.; VITHANAGE, R. S.; PHILLIPS, D.A.; WALKER and DASGUPTA, P.K. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 629-636.

TOLBERT, L.M.; SOLNTSEV, K.M. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 19-27.

TONDO, D.W.; PRIEBE, J.M.; SOUZA, B.S.; PRIEBE, J.P.; BUNTON, C.A.; NOME, F. *J. Phys. Chem. B*, vol. 111, 41, **2007**, 11867-11869.

VARGAS, L.V.; SAND, J.; BRANDAO, T.A.S.; FIEDLER, H.D.; QUINA, F.H.; NOME, F. *The Analyst*, 130, **2005**, 242 – 246.

WELLER, A. *Z.Elektrochem.* **1952**, 56, 662-668.